昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2017, 60(6): 642 - 649　　doi: 10.16380/j.kcxb.2017.06.004

多菌灵亚致死剂量对意大利蜜蜂幼虫生长发育和解毒酶系活性的影响

王　康，庞　倩，张文文，吉　挺*

（扬州大学动物科学与技术学院，江苏扬州 225000）

摘要：【目的】本研究旨在探讨亚致死浓度水平的多菌灵农药对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 幼虫生长发育和解毒酶系活性的影响。【方法】以饲喂添加不同浓度(0.25 和 0.75 mg/g a.i.,校准死亡率 <5%)多菌灵的饲料作为处理组,以基础饲料作为对照。实验室内人工饲养意大利蜜蜂 1 日龄幼虫直至羽化出房,记录和测定幼虫生长发育指标(蛹重、化蛹率和羽化率),并测定 1 日龄蛹的保幼激素和蜕皮激素滴度、总蛋白浓度以及总超氧化物歧化酶和主要解毒酶系活性。【结果】对照组与各处理组之间的意大利蜜蜂蛹体重、化蛹率、羽化率无显著差异($P > 0.05$);0.75 mg/g a.i. 多菌灵处理组中总蛋白浓度显著降低($P < 0.05$);0.25 和 0.75 mg/g a.i. 多菌灵处理组中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性显著增加($P < 0.05$),分别是对照组的 135% 和 128%;0.25 和 0.75 mg/g a.i. 多菌灵处理组中保幼激素(JH)滴度显著高于对照组($P < 0.05$),分别为对照组的 1.57 和 1.75 倍;其拮抗激素蜕皮激素(Ecd)滴度则低于对照组,分别只有对照组的 62% 和 65%,差异极显著($P < 0.01$)。处理组幼虫化蛹时间延长;对解毒酶系酶活性测定发现,细胞色素 P450 (CYP450)和羧酸酯酶(CarE)活性出现相同的变化趋势,具体表现为在 0.25 mg/g a.i. 多菌灵处理组中被激活升高($P < 0.05$),在 0.75 mg/g a.i. 多菌灵处理组中激活效应消失,酶活性下降,但并未出现抑制现象($P > 0.05$)。谷胱甘肽- S-转移酶(GST)活性在对照组和处理组间略有不同,但无显著差异($P > 0.05$)。【结论】选取的亚致死剂量多菌灵农药不会导致蜜蜂急性死亡,但会对幼虫生长发育具有抑制作用,对解毒酶系也产生不同程度的影响,这可能对蜜蜂的健康发育和日后蜂群的稳定具有潜在的危害。

关键词：意大利蜜蜂；多菌灵；亚致死效应；生长发育；解毒酶系

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2017)06-0642-08

Effects of sublethal doses of carbendazim on the growth and detoxifying enzyme activities of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) larvae

WANG Kang, PANG Qian, ZHANG Wen-Wen, JI Ting* (College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract:【Aim】This study aims to explore the sublethal effects of carbendazim on the growth and development and detoxifying enzyme activities of the larvae of the Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*.【Methods】Larvae in two treatment groups were fed with diets containing 0.25 and 0.75 mg/g a.i. carbendazim (relative mortality rate <5%), respectively, while those in the control group with the normal diets. All larvae were reared with different diets until eclosion, and their growth indexes (pupal weight, pupation rate and eclosion rate), total protein concentration, and T-SOD and detoxifying enzyme activities were assayed.【Results】There were no significant differences in the pupal weight, pupation rate and eclosion rate of *A. m. ligustica* among all groups ($P > 0.05$). The total protein concentration in pupae decreased in the treatment group fed with diets containing 0.75 mg/g a.i. carbendazim ($P <$

基金项目：国家自然科学基金项目(31372382)

作者简介：王康，男，1992 年生，江苏连云港人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂科学，E-mail: jimidaren@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: tji@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-03-21；接受日期 Accepted: 2017-05-01

0.05). The total superoxide dismutase activities in the treatment groups fed with diets containing 0.25 and 0.75 mg/g a.i. carbendazim tended to be significantly higher than that in the control group, being 1.35- and 1.28-fold as high as the control group, respectively. The juvenile hormone titer in the treatment groups fed with diets containing 0.25 and 0.75 mg/g a.i. carbendazim were significantly higher than that in the control group, being 1.57- and 1.75-fold as high as the control group, respectively. Ecdysone titers in the treatment groups fed with diets containing 0.25 and 0.75 mg/g a.i. carbendazim were only 62% and 65% of the control group, respectively ($P < 0.05$). The cytochrome P450 (CYP450) and carboxylesterase (CarE) activities were increased in the low-dose (0.25 mg/g a.i.) treatment group ($P < 0.05$), and then returned to the normal level in the high-dose (0.75 mg/g a.i.) treatment group, but no inhibitory effect on the activities of the two enzymes was found ($P > 0.05$). There was no significant difference in glutathione-S-transferase (GST) activity between treatment groups and the control group ($P > 0.05$). 【Conclusion】These results demonstrate that sublethal doses of carbendazim restrain the growth and development of *A. m. ligustica* larvae, but do not cause their acute death, and may cause potential harm to the stability and development of the colony.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; carbendazim; sublethal effect; growth and development; detoxifying enzyme

蜜蜂是自然界中最重要的传粉昆虫之一，其所具有的经济效益、社会效益和生态效益对于农业生产和维护生态系统的生物多样性具有重要而深远的意义(Potts *et al.*, 2010; Breeze *et al.*, 2014)。1990 年至今，因农药中毒导致蜜蜂死亡、蜂群数量骤减的现象遍及许多国家，已成为全球普遍关注的环境污染与生物安全问题(卜元卿等, 2009)。随着低毒农药的使用推广，在某些程度上缓解了高毒农药引起的蜜蜂急性中毒，但低毒农药的亚致死效应带来的一系列潜在的影响也逐渐地引起学者们的重视。

前人研究发现，农药的亚致死效应会对蜜蜂的生理生化和行为学产生影响。新烟碱类农药的亚致死效应可以减少脑补蕈形体部位的突触单元，影响蜜蜂的视觉和嗅觉(Peng and Yang, 2016)。吴艳艳等(2014)发现用亚致死浓度吡虫啉处理蜜蜂可以导致神经细胞的凋亡，并观察到自噬现象。新烟碱农药的亚致死效应导致的蜜蜂免疫下降，抗病能力降低等也被报道(Brandt *et al.*, 2016)。亚致死剂量的杀螟硫磷(有机磷)和氯氰菊酯(除虫菊酯)会导致 Na^+/K^+-ATP 酶和神经系统中乙酰胆碱酯酶异常，乙酰胆碱酶的异常直接影响蜜蜂的导航定位能力(Papaefthimiou and Theophilidis, 2001; Schmuck, 2004; Claudianos *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 2012)。低浓度溴氰菊酯处理的蜂王产卵量下降 20%，产卵期也明显不同(代平礼等, 2007)。其他一些行为学研究，如亚致死剂量农药处理后导致蜜蜂分工行为不明显，采集酿蜜混乱，巢房清洁行为也明显减少，辨别同群蜜蜂能力下降，学习行为能力降低，记忆能力受到影响等相继被报道(Kreissl and Bicker, 1989; Vandame and Belzunces, 1998; Alix *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2012)。

多菌灵(英文名: carbendazim; 分子式: $C_9H_9N_3O_2$)是一种广谱性杀菌剂。近年来，在我国农业生产中被频繁施用于农业作物，尤其是一些用蜜蜂授粉的大棚蔬菜和茶花、油菜等经济类蜜源植物。叶孟亮等(2016)检测了大陆地区 282 份苹果样品中农药残留，在几种常用农药中，多菌灵检出率最高，达到 81.9%。Zhou 等(2016)对中国大陆 8 个省份 54 份花粉进行农药残留检测，结果发现多菌灵农药的检出率(77.1%)和最大残留量(4 516 ng/g)均占第一。我国养蜂主要采取追花逐蜜的转地放蜂模式，多菌灵农药暴露污染是许多转地蜂场在追蜜过程中不可避免的负面压力，作为环境指示器的蜜蜂很容易受到多菌灵农药的胁迫。但是，国内外对多菌灵这种农药的研究较少，尤其关于多菌灵亚致死效应对蜜蜂的影响报告并不多见，因此对多菌灵农药亚致死效应对蜜蜂生长发育过程影响的研究很有必要。

近年来，国内外不断发生蜜蜂群落大量减少现象，如我国江浙地区的越冬期蜜蜂大量死亡事件，目前尚未找到原因，怀疑可能是大蜂螨、多重病毒、微孢子虫感染和其他一系列负面压力等多重因素协同作用(郑火青等, 2016)。2006 年蜜蜂全基因组测序完成后，发现蜜蜂种群具有的已知解毒酶基因家族数量较少(Weinstock, 2006)。单从基因组的角

度去考虑,蜜蜂的解毒能力是偏弱的,因此应重点分析农药胁迫与越冬蜂死亡事件的联系。鉴于近年来国内多菌灵农药频繁使用的现状,在寻找越冬蜂死亡原因过程中,多菌灵农药更是不可忽略的一点。生长发育指标和解毒酶系活性指标是研究农药对蜜蜂影响的常用指标。本试验理论结合实际,在实验室中模拟幼虫生长发育环境,从非急性致死角度去分析多菌灵农药对蜜蜂幼虫的生长发育和解毒酶系活性的影响。一是探究多菌灵农药对蜜蜂的危害,为我国农药使用安全性评价提供实验参考。二是试图揭示越冬蜂的死亡与多菌灵的施用是否存在关联,以期为我国越冬蜂大量死亡事件的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

试验蜜蜂来自扬州大学实验蜂场,为本地意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*。

1.2 供试试剂及主要仪器

保幼激素(juvenile hormone, JH)和蜕皮激素(ecdysterone, Ecd)标准品,TritonX-100,α-乙酸萘酯,毒扁豆碱,固蓝 B 盐,二硝基氯苯(CDNB),二硫对硝基苯甲酸(DTNB),还原型谷胱甘肽(GSH)购自美国 Sigma 化学药品公司;7-乙氧基香豆素,磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$),磷酸二氢钾(KH_2PO_4)购于苏州科铭公司;总蛋白浓度,总超氧化物歧化酶(T-superoxide dismutase, T-SOD)活力测定试剂盒购自南京建成生物工程有限公司(货号分别 A045-4 和 A001-3);酵母来自 Oxoid 生物公司;高活蜂王浆,蜂蜜均来自扬州大学实验蜂场;多菌灵为国内市场常见的国光农化公司产品(农药登记证号:PD85150-35,有效成分 50%);其余化学试剂均为国产分析纯。色谱柱为美国安捷伦 ZORBAXSB-Aq 液相色谱柱(100 mm × 2.1 mm × 3.5 μm);恒温培育箱来自江南宁波仪器制造厂(HWS-328);酶标仪型号为帝肯 Infinite F50。

1.3 试虫处理

选取意大利蜜蜂 1 日龄幼虫 432 头,随机分为 3 组,每组 3 个重复,每个重复 48 头幼虫,饲喂至 1 日龄蛹,用于测定蜂蛹的重量、蜕皮激素和保幼激素滴度、虫体总蛋白浓度以及 T-SOD 和主要解毒酶活性等指标。测定时,单个指标测定 3 组生物学重复,每组 6 个平行处理,所有待测样本为同一批次样本。取 1 日龄蜜蜂幼虫 864 头,随机分为 3 组,每组 3 个重复,每个重复 96 头,饲喂至羽化出房,用于测定化蛹率和羽化率。随机 3 组分别为对照组(CK)、处理组 1 和处理组 2。参考刘光楠和曾志将(2010)蜜蜂幼虫饲养配方,按照新鲜王浆、蜂蜜、无菌水、酵母粉比例为 55∶8∶36.5∶0.5(m/m)配制基础饲料。对照组(CK)喂食基础饲料,分别向处理组 1 和处理组 2 基础饲料中添加 0.5 和 1.5 mg/g 50% 多菌灵农药(有效成分分别为 0.25 和 0.75 mg/g)。按照刘光楠和曾志将(2010)报道的实验室饲养幼虫方法,饲喂 1 日龄蜜蜂幼虫分别至 1 日龄蛹期和羽化出房。

1.4 化蛹率、羽化率计算

幼虫化蛹率(%) = 幼虫化蛹总数/幼虫总数;羽化率(%) = 成蜂羽化出房总数/化蛹总数。

1.5 蛹重测定

从各个组随机取出 48 头 1 日龄蛹,超纯水反复洗涤,吸水纸吸干后电子分析天平称量体重,记录后置于 −70℃ 超低温冰箱保存,用于测定蜕皮激素和保幼激素滴度、总蛋白浓度以及 T-SOD 和主要解毒酶系活性等指标。

1.6 蜕皮激素和保幼激素浓度测定

蜕皮激素和保幼激素浓度测定采用液质联用(HPLC-MS)技术方法进行(沈芳, 2015)。样本处理:称取 1 g 待测样本,液氮研磨后加入 5 mL 甲醇和 3 mL 异辛烷,充分振动。超声提取 15 min 后 10 000 r /min 离心 5 min。倒掉上清液,加入 3 mL 异辛烷后同条件重复超声提取和离心过程。倒掉上清液,重复超声提取和离心过程。加入适量甲醇,40℃下氮气吹干。用 1.0 mL 乙腈-纯水溶液(2∶8, v/v)超声复溶残留物,静置待上机分析。

液相色谱分析条件:流速:0.3 mL/min;柱温:30℃;流动相 A(0.1% 乙酸水溶液),流动相 B(0.1% 乙酸的乙腈溶液)。

质谱分析条件:选择电喷雾电离离子源,正离子扫描。喷雾毛细管电压:3 000 V;雾化气皮力:35 psi;干燥气(N_2)流速:9 L/min;干燥气温度:350℃;全扫描模式扫描范围:m/z = 200 ~ 2 000。

此试验在中国农业科学院蜜蜂研究所进行。

1.7 总蛋白和总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力测定

采用二喹啉甲酸(BCA)法(Smith *et al*., 1985)和水溶性四唑盐(WST)法(Deng *et al*., 2013)测定总蛋白浓度和总超氧化物歧化酶活力。取幼虫按 1∶9 (m/v)加入生理盐水。冰水浴条件机械匀浆,

2 500 ~ 3 000 r/min，离心 10 min，取上清液稀释至 1% 待用。按照试剂盒（南京建成，货号分别 A045-4 和 A001-3）提示的加样和计算方法，获得总蛋白和 T-SOD 活力数值（U/mg pro）。

1.8　解毒酶活性测定

细胞色素 P450（cytochrome P450，CYP450）活性测定参照 Arukwe 和 Goksøyr（1997）方法测定，以 7-乙氧基香豆素为底物。羧酸酯酶（carboxylesterase，CarE）活性测定按照鲁艳辉和高希武（2016）方法进行，底物为 α-乙酸萘酯。谷胱甘肽-S-转移酶（glutathione-S-transferase，GST）活性测定按照余慧灵等（2015）方法进行，底物为 2,4-二硝基氯苯。虫体匀浆过程温度不宜过高，需要冰水浴处理。

1.9　数据处理

试验记录数据采用 EXCEL 软件统计处理，采用 ANOVA 中的 LSD 多重比较进行分析。数据分析处理使用软件 SPSS 20.0 完成，文中全部数据均为平均值 ± 标准误，以 $P < 0.05$ 作为差异显著性标准。

2　结果

2.1　多菌灵亚致死剂量对意大利蜜蜂幼虫生长发育的影响

多菌灵亚致死剂量处理后对意大利蜜蜂幼虫所化蛹的蛹重、化蛹率和羽化率影响见表 1。由表 1 可知，对照组与处理组之间蛹重、化蛹率和羽化率差异都不显著（$P > 0.05$）。结果表明，试验选取的亚致死剂量多菌灵处理不会影响蜜蜂蛹重、化蛹率和羽化率。

表 1　多菌灵亚致死剂量对意大利蜜蜂幼虫生长发育的影响

Table 1　Effects of sublethal doses of carbendazim on the growth and development of *Apis mellifera ligustica* larvae

饲料中多菌灵浓度（mg/g a. i） Concentration of carbendazim in the diet	蛹重（mg） Pupal weight	化蛹率（%） Pupation rate	羽化率（%） Eclosion rate
0（CK）	203.23 ± 11.19 a	93.2 ± 2.24 a	81.3 ± 4.23 a
0.25	201.46 ± 9.27 a	91.9 ± 1.83 a	82.9 ± 4.61 a
0.75	204.33 ± 8.46 a	92.5 ± 1.99 a	81.5 ± 5.82 a

CK：基础饲料 Normal diet. 表中数据为平均值 ± 标准误，同列数据后不同的小写字母代表差异显著（LSD，$P < 0.05$）。Data in the table are means ± *SE*. Different small letters following the data in a column represent significant difference (LSD, $P < 0.05$).

2.2　多菌灵亚致死剂量对意大利蜜蜂幼虫总蛋白浓度和 T-SOD 活性影响

对比对照组，0.25 mg/g a. i. 多菌灵处理组中虫体总蛋白浓度无显著变化（$P > 0.05$），0.75 mg/g a. i. 多菌灵处理组中则显著减少（$P < 0.05$），呈现下降趋势（图 1：A），表明蛋白的合成受到抑制；蜜蜂幼虫化蛹时处理组中 T-SOD 活性均要高于对照组，分别为对照组的 135% 和 128%，差异显著（$P < 0.05$）（图 1：B），表明多菌灵处理后幼虫的 SOD 活性增高。

2.3　多菌灵亚致死剂量对意大利蜜蜂幼虫保幼激素和蜕皮激素滴度影响

蜜蜂幼虫的保幼激素和蜕皮激素滴度见图 2。由图可知，经过多菌灵农药处理的幼虫保幼激素滴度增加（图 2：A），分别为对照组的 1.57 和 1.75 倍，差异显著（$P < 0.05$）；而蜕皮激素滴度则表现出相反的变化规律（图 2：B），处理组的蜕皮激素滴度明显低于对照组，分别只有对照组的 62% 和 65%，差异极显著（$P < 0.01$）。结果表明试验浓度的多菌灵可以促进保幼激素和抑制蜕皮激素分泌。

2.4　多菌灵亚致死剂量对意大利蜜蜂幼虫解毒酶活性影响

蜜蜂幼虫内的解毒酶活性见图 3。从图 3（A）可以看出 0.25 mg/g a. i. 多菌灵处理组中 CYP450 的比活力最高，为对照组的 1.17 倍，差异显著（$P < 0.05$）；但 0.75 mg/g a. i. 多菌灵处理组组中 P450 的激活效应消失，比活力与对照组无显著差异（$P > 0.05$）。CarE 的比活力变化与 CYP450 类似（图 3：B），在 0.25 和 0.75 mg/g a. i. 多菌灵处理组中表现出先升高再降低的趋势，但未出现抑制现象（$P > 0.05$）。GST 比活力的测定结果见图 3（C），可以看出 0.25 mg/g a. i. 多菌灵处理组中 GST 比活力低于对照组，0.75 mg/g a. i. 多菌灵处理组中 GST 比活力要高于对照组，但是差异不显著（$P > 0.05$）。

3　讨论

一般采用点滴法、喂毒法和熏蒸法等方法用于农药对蜜蜂安全性评价的测定，但是选取不同测定方法往往得到的结果差异较大（刁青云，2006）。本

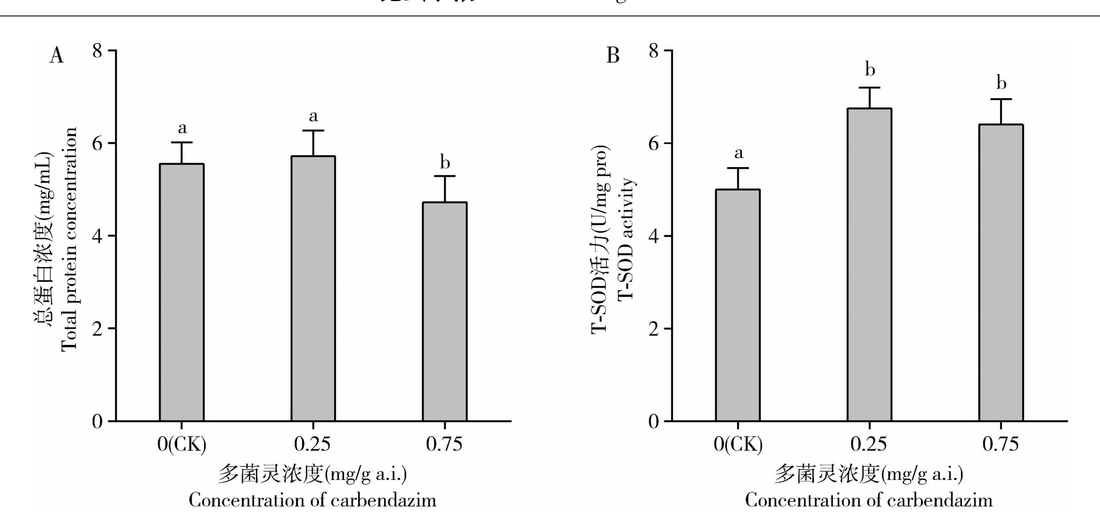


图 1 不同多菌灵浓度对意大利蜜蜂幼虫总蛋白浓度(A) 和 T-SOD 活力(B)影响

Fig. 1 Total protein concentration (A) and T-SOD activities (B) in *Apis mellifera ligustica* larvae after exposed to different concentrations of carbendazim

意大利蜜蜂分别取食基础饲料(CK)以及含 0.25 和 0.75 mg/g a. i. 多菌灵的饲料。图中数据为平均值 ± 标准误,柱上不同大小写字母分别代表差异极显著(LSD, $P < 0.01$)和差异显著(LSD, $P < 0.05$); 图 2 和 3 同。*A. m. ligustica* larvae were fed with the normal diet (CK) and diets containing 0.25 and 0.75 mg/g a. i. carbendazim, respectively. Data in the table are means ± *SE*. Different capital and small letters above bars represent extremely significant difference (LSD, $P < 0.01$) and significant difference (LSD, $P < 0.05$), respectively. The same for Figs. 2 and 3.

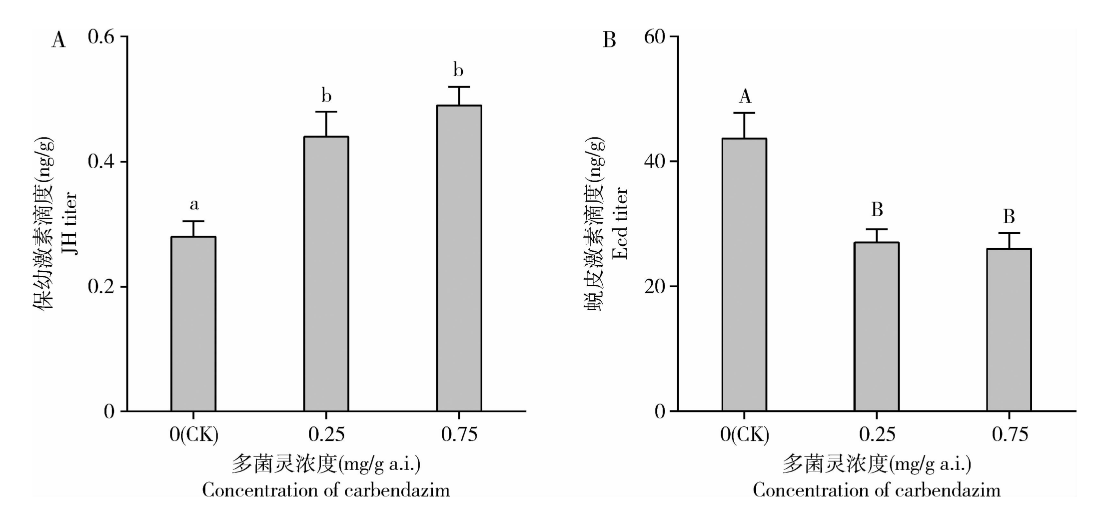


图 2 不同多菌灵浓度对意大利蜜蜂幼虫保幼激素(A)和蜕皮激素(B)滴度的影响

Fig. 2 Titer of JH (A) and Ecd (B) in *Apis mellifera ligustica* larvae after exposed to different concentrations of carbendazim

试验中模拟幼虫发育环境,根据已有多菌灵农药对蜜蜂的毒理研究(苍涛等, 2012; Stoner and Eitzer, 2013; Kasiotis *et al*., 2014)和前期预实验的摸索,确定绝对亚致死浓度下相对低浓度和相对高浓度(分别为 0.25 和 0.75 mg/g a. i.)。经过预实验中的验证,这两组农药处理后蜜蜂的校准死亡率均 < 5%。因此,本试验中各试验组间蜜蜂化蛹率和羽化率都无差异的结果符合实际。

保幼激素和蜕皮激素是蜜蜂幼虫发育过程中的重要调控激素。在二者协调作用下,幼虫得以正常的蜕皮,蜕皮后仍保持幼虫性状,在昆虫发育、变态过程中起重要的调控作用(Abdou *et al*., 2011)。对试验中保幼激素和蜕皮激素滴度分析结果表明,多菌灵农药胁迫可以导致保幼激素滴度上升,蜕皮激素滴度显著下降。其影响是直接干预幼虫稳定的发育,造成蜜蜂化蛹的发育迟缓,在试验中也观察到处理组化蛹日龄比对照组要延缓的现象(数据未列出)。与前人报道的昆虫处于非正常的发育环境时

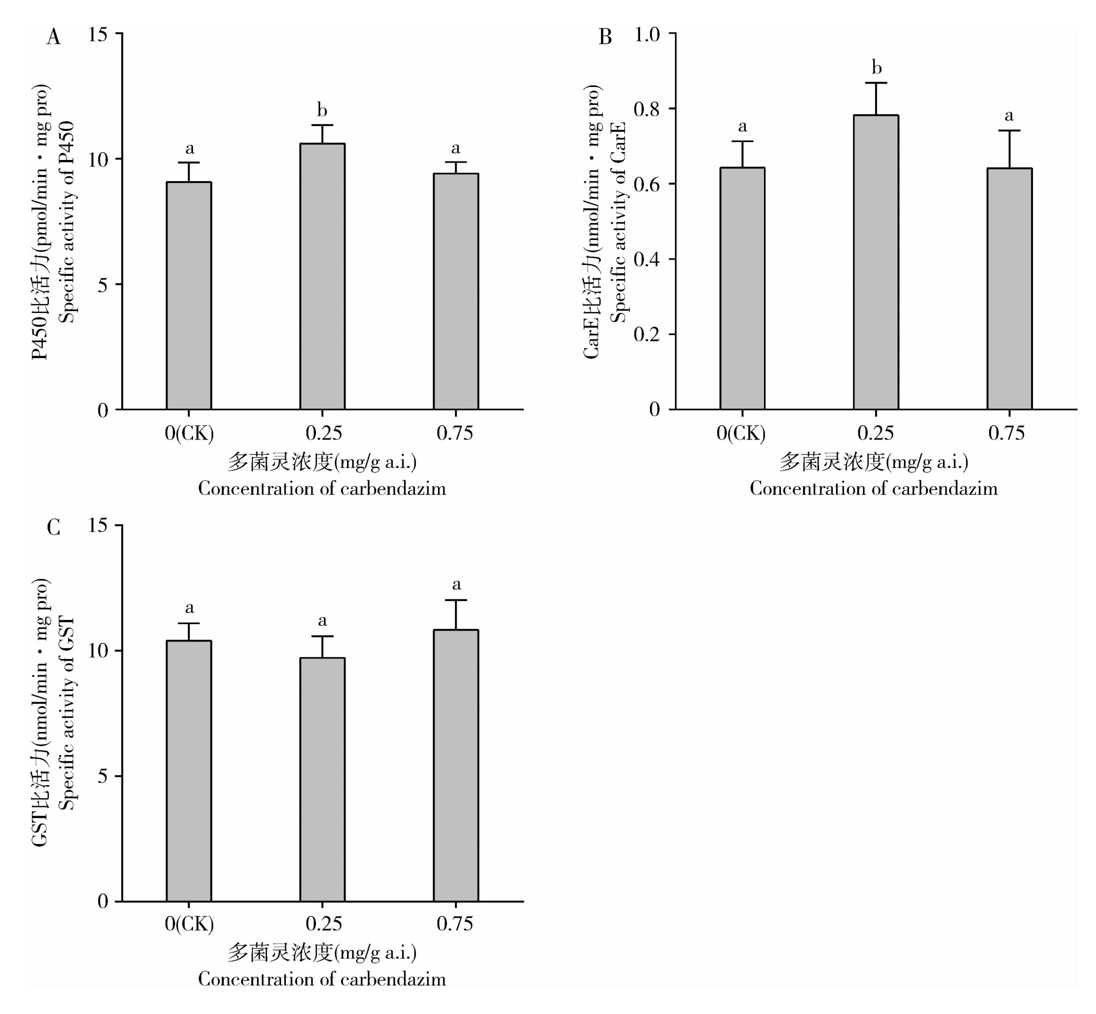


图 3　不同多菌灵浓度处理对蜜蜂幼虫体内解毒酶活性的影响

Fig. 3　Detoxifying enzyme activities in *Apis mellifera ligustica* larvae after exposed to different concentrations of carbendazim

A：细胞色素 P450 CYP450；B：羧酸酯酶 CarE；C：谷胱甘肽 S-转移酶 GST.

会出现异常滞育现象(徐卫华，2008；黎万顺等，2012)和其他农药胁迫导致幼虫孵化出现延缓发育的现象(Czoppelt and Rembold，1988；吴艳艳等，2014；谭丽超等，2015)一致。昆虫出现发育延缓现象，常伴随着蛋白合成水平相对降低(刘流等，2010)。因此我们对处理组的总蛋白含量进行分析，结果发现高浓度多菌灵处理组中虫体总蛋白浓度显著低于对照组，与有报道发现多菌灵胁迫可以导致虱目鱼体内总蛋白减少的结果一致(Palanikumar *et al*.，2014)。蛋白是维持机体正常运行的重要物质，其中一些功能蛋白在蜜蜂的生长发育过程中更是不可或缺。目前尚未知道多菌灵处理会导致蜜蜂体内哪些蛋白的合成减少，这些蛋白的种类、功能及其造成影响有待进一步探究。多菌灵胁迫导致蜜蜂幼虫发育延缓，蛋白合成下降的现象，这对保证蜜蜂的健康发育，维持日后蜂群稳定具有潜在的危害。

本研究结果表明，多菌灵农药胁迫对蜜蜂体内 SOD 的生成起到激活作用，使得处理组 SOD 的活力升高。与查黎春(2011)和李灿(2011)报道的低剂量下有害外源物质对昆虫 SOD 活性影响的研究结果一致。SOD 是一种抗氧化酶，可对抗和阻断因氧自由基对细胞造成的损害，并及时修复受损细胞，复原自由基对细胞造成的伤害，增强机体的抗逆性，是昆虫的重要防御手段，与蜜蜂寿命的长短和抗逆性的强弱有直接的联系(Corona and Robinson，2006)。SOD 活性的上升也从侧面反映出处理组蜜蜂幼虫体内确实产生过多伤害机体的自由基。机体内抗氧化系统受到攻击，防御机制开启，应答调节使得 SOD 活性增加，用来清理体内产生异常多的自由基。

CYP450，GST 和 CarE 都是蜜蜂体内重要的解毒酶。CYP450 和 CarE 是第一解毒阶段主要解毒

酶,GST 主要作用在第二阶段(Claudianos *et al*., 2006; Berenbaum and Johnson, 2015)。因此本试验对以上 3 种酶的比活力进行测定和比较,结果显示低剂量多菌灵农药处理可以诱导 CYP450 和 CarE 激活,但在高浓度处理后,其激活效应褪去,酶活性回归正常。结合生理学和药理学知识,可以推测 0.75 mg/g a.i. 多菌灵处理组中酶活性表现出的正常水平,与对照组可能只是在数值上相似,但是具体生理意义可能不同。推测可能是此阶段机体的免疫系统在面临外源毒素侵入时的抵抗和自身在无法完全调控情况下妥协的结果。如果再增加多菌灵的处理浓度,那么酶活性可能会表现出抑制的现象(刁青云, 2006; Sonoda, 2010; You *et al*., 2013)。试验结果中 GST 比活力与对照组相比,并未出现显著变化。孟丽峰(2013)通过吡虫啉饲喂处理意大利蜜蜂 24 h 后发现,P450 和 CarE 在低剂量(LC_5 ~ LC_{20})下就可以被激活,而 GST 的激活范围偏高(LC_{20} ~ LC_{70})。因此试验中 GST 活力无显著变化的原因很可能是试验采用的浓度胁迫不足以诱导解毒酶 GST 的活性发生变化,而且 GST 解毒作用主要体现在第二阶段。由于多菌灵农药对蜜蜂的影响研究报道较少,尚未有明确的资料辅助可以排除多菌灵农药这种外源毒素本身不具有诱导 GST 的可能性。

综上所述,我们的研究结果表明,试验选取的亚致死剂量多菌灵农药胁迫不会导致蜜蜂的急性死亡,但影响蜜蜂幼虫生长发育过程中生理生化状态,包括蛋白合成的下降,抗氧化系统和免疫系统受到攻击等。这些潜在的危害可能会在外界温度较低,蜜粉源不充足的越冬期更易表现出来,使得蜜蜂无法抵挡正常的低温和病原的损害,容易引起其他继发性疾病或者直接导致蜜蜂死亡。因此多菌灵农药胁迫可能对越冬蜂死亡事件起到推动作用。

参考文献(References)

Abdou MA, He QY, Wen D, Zyaan O, Wang J, Xu JJ, Baumann AA, Joseph J, Wilson TG, Li S, Wang J, 2011. *Drosophila* Met and Gce are partially redundant in transducing juvenile hormone action. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 41(12): 938 – 945.

Alix A, Cortesero AM, Nénon JP, Anger JP, 2001. Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. *Environ. Toxicol. Chem*., 20(11): 2530 – 2536.

Arukwe A, Goksøyr A, 1997. Changes in three hepatic cytochrome P450 subfamilies during a reproductive cycle in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J. Exp. Zool. A*, 277(4): 313 – 325.

Berenbaum MR, Johnson RM, 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honeybees. *Curr. Opin. Insect Sci*., 10: 51 – 58.

Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R, 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol*., 86: 40 – 47.

Breeze TD, Vaissière BE, Bommarco R, Petanidou T, Seraphides N, Kozák L, Scheper J, Biesmeijer JC, Kleijn D, Gyldenkærne S, Moretti M, Holzschuh A, Steffan DI, Stout JC, Pärte M, Zobe M, Potts SG, 2014. Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS ONE*, 9(1): e82996.

Bu YQ, Shan ZJ, Zhou ZY, Lin XL, 2009. Research review on biological toxicity and safety assessment of pesticides to bee. *Agrochemicals*, 48(6): 399 – 401. [卜元卿, 单正军, 周军英, 林小丽, 2009. 农药对蜜蜂生物毒性及安全性评价研究回顾. 农药, 48(6): 399 – 401]

Cang T, Wang YH, Yu RX, Wu CX, Chen LP, Wu SG, Zhao XP, 2012. The acute toxicity and risk assessment of 25 pesticides used in nectar plant to *Apis mellifera* L. *Acta Agric. Zhejiang*., 24(5): 853 – 859. [苍涛, 王彦华, 俞瑞鲜, 吴长兴, 陈丽萍, 吴声敢, 赵学平, 2012. 蜜源植物常用农药对蜜蜂急性毒性及风险评价. 浙江农业学报, 24(5): 853 – 859]

Cha LC, 2011. The Influences of the Three Pesticides to *Malacosoma neustria testacea* Motschulsy and *Lymantria dispar* Linnaeus Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) Activity. PhD Dissertation, Northeast Forestry University, Harbin. [查黎春, 2011. 三种农药对天幕毛虫、舞毒蛾超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文]

Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler, MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol*., 15(5): 615 – 636.

Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol*., 15(5): 687 – 701.

Czoppelt C, Rembold H, 1988. Effect of parathion on honey bee larvae reared *in vitro*. *J. Pest Sci*., 61(5): 95 – 100.

Dai PL, Wang Q, Sun JH, Zhou T, Liu F, Wang X, 2007. Bioassay of four pesticides on *Apis mellifera*. *Agrochemicals*, 46(8): 546 – 547. [代平礼, 王强, 孙继虎, 周婷, 刘锋, 王星, 2007. 4 种农药对意大利蜜蜂的毒力测定. 农药, 46(8): 546 – 547]

Deng Y, Wang W, Yu PF, Xi ZJ, Xu LJ, Li XL, He NY, 2013. Comparison of taurine, GABA, Glu, and Asp as scavengers of malondialdehyde *in vitro* and *in vivo*. *Nanoscale Res. Lett*., 8(1): 190.

Diao QY, 2006. Comparative Study on Toxicological Characteristics of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [刁青云, 2006. 东方蜜蜂和西方蜜蜂的毒理学特性比较研究. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]

Henry M, Beguin M, Requier F, Rollinl O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A, 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(336): 348 – 350.

Kasiotis KM, Anagnostopoulos C, Anastasiadou P, Machera K, 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and pollen by LC-MS/MS

screening: reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.*, 485－486(1): 633－642.

Kreissl S, Bicker G, 1989. Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *J. Comp. Neurol.*, 286(1): 71－84.

Li C, 2011. Effect of controlled atmosphere of carbon dioxide (CO_2) on super oxide dismutase (SOD) activity of three storage pests in Chinese medicinal materials. *J. Anhui Agric. Sci.*, 39(23): 14187－14188.［李灿，2011. 二氧化碳气调对 3 种中药材储藏期害虫 SOD 酶活性的影响. 安徽农业科学，39(23)：14187－14188］

Li WS, Chen B, He ZB, 2012. Comparison of the developmental and morphological characteristics of non-, winter- and summer-diapausing pupae of the onion maggot, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(7): 816－824.［黎万顺，陈斌，何正波，2012. 葱蝇非滞育、冬滞育和夏滞育蛹发育和形态特征比较. 昆虫学报，55(7)：816－824］

Liu GN, Zeng ZJ, 2010. Advances on technology of honeybee larvae reared in vitro and its application. *J. Honeybee*, 30(12): 32－34.［刘光楠，曾志将，2010. 人工饲养蜜蜂幼虫技术的研究进展. 蜜蜂杂志，30(12)：32－34］

Liu L, He LF, Liu H, Yan R, 2010. Research progress of insects diapause. *J. Anhui Agric. Sci.*, 38(14): 7409－7411.［刘流，贺莉芳，刘晖，晏容，2010. 昆虫滞育的研究进展. 安徽农业科学，38(14)：7409－7411］

Lu YH, Gao XW, 2016. Inhibiting effects of common insecticides on carboxylesterase activity in *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) and their synergism to beta-cypermethrin. *Acta Entomol. Sin.*, 59(11): 1151－1158.［鲁艳辉，高希武，2016. 常用杀虫剂对麦长管蚜和禾谷缢管蚜羧酸酯酶活性的抑制及对高效氯氰菊酯的增效作用. 昆虫学报，59(11)：1151－1158］

Meng LF, 2013. Effects of Imidacloprid on Activities of Detoxifying Enzymes and Development on *Apis mellifera*. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing.［孟丽峰，2013. 吡虫啉对蜜蜂解毒酶和生长发育的影响. 北京：中国农业科学院硕士学位论文］

Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M, 2014. Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 11(3): 765－774.

Papaefthimiou C, Theophilidis G, 2001. The cardiotoxic action of the pyrethroid insecticide deltamethrin, the azole fungicide prochloraz, and their synergy on the semi-isolated heart of the bee *Apis mellifera macedonica*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 69(2): 77－91.

Peng YC, Yang EC, 2016. Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honeybee mushroom bodies. *Sci. Rep.*, 6: 19298.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, 25(6): 345－353.

Schmuck R, 2004. Effects of a chronic dietary exposure of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to imidacloprid. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 47(4): 471－478.

Shen F, 2015. Research on the Effect of the Instar of the Grafted Larvae on Growth and Development and Ovary Proteomic of Queen. MSc Thesis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu.［沈芳，2015. 移虫日龄对蜂王生长发育及蜂王卵巢蛋白质组学的影响. 江苏扬州：扬州大学硕士学位论文］

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EJ, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1): 76－85.

Sonoda S, 2010. Molecular analysis of pyrethroid resistance conferred by target insensitivity and increased metabolic detoxification in *Plutella xylostella*. *Pest Manag. Sci.*, 66(66): 572－575.

Stoner KA, Eitzer BD, 2013. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees *Apis mellifera* in connecticut. *PLoS ONE*, 8(10): e77550.

Tan LC, Bu YQ, Cheng Y, Zhou JY, Shan ZJ, 2016. Indoor toxicity research of imidacloprid on honeybee larvae. *Asian J. Ecotoxicol.*, 11(4): 253－257.［谭丽超，卜元卿，程燕，周军英，单正军，2016. 吡虫啉对蜜蜂幼虫的室内毒性研究. 生态毒理学报，11(4)：253－257］

Vandame R, Belzunces LP, 1998. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neurosci. Lett.*, 251(1): 57－60.

Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, *et al.*, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114): 931－949.

Wu YY, Zhou T, Wubie AJ, Wang Q, Dai PL, Jia HR, 2014. Apoptosis in the nerve cells of adult honeybee *Apis mellifera ligustica* brain induced by imidacloprid. *Acta Entomol. Sin.*, 57(2): 194－203.［吴艳艳，周婷，WUBIE AJ，王强，代平礼，贾慧茹，2014. 吡虫啉对成年意大利蜜蜂脑神经细胞致凋亡作用. 昆虫学报，57(2)：194－203］

Xu WH, 2008. Advances in insect diapause. *Chin. Bull. Entomol.*, 45(4): 512－517.［徐卫华，2008. 昆虫滞育的研究进展. 昆虫知识，45(4)：512－517］

Yang EC, Chang HC, Wu WY, Chen YW, 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE*, 7(11): e49472.

Ye ML, Nie JY, Xu GF, Yan Z, Zheng LJ, 2006. Residue and dietary exposure risk assessment of four pesticides in apple. *Agric. Sci. Sin.*, 49(7): 1289－1302.［叶孟亮，聂继云，徐国锋，闫震，郑丽静，2016. 苹果中 4 种常用农药残留及其膳食暴露评估. 中国农业科学，49(7)：1289－1302］

You MS, Yue Z, He WY, *et al.*, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genet.*, 45(2): 220－225.

Yu HL, Xiang X, Yuan GX, Chen YQ, Wang XG, 2015. Effects of sublethal doses of cyantraniliprole on the growth and development and the activities of detoxifying enzymes in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(6): 634－641.［余慧灵，向兴，袁贵鑫，陈羿渠，王学贵，2015. 溴氰虫酰胺亚致死剂量对甜菜夜蛾生长发育及体内解毒酶活性的影响. 昆虫学报，58(6)：634－641］

Zheng HQ, Su XL, Ji T, Hua QY, Hu FL, 2016. How to keep colony health: from the respect of wintering honeybee death. *J. Bee*, 36(4): 12－15.［郑火青，苏晓玲，吉挺，华启云，胡福良，2016. 从越冬期蜜蜂死亡谈蜜蜂健康养殖. 蜜蜂杂志，36(4)：12－15］

Zhou T, Wu YC, Liu QQ, Shi YH, Zhou LJ, Liu ZY, Yu LS, Cao HQ, 2016. Multi-residue analysis of pesticide residues in crude pollens by UPLC-MS/MS. *Molecules*, 21(12): 1652.

（责任编辑：赵利辉）